



Universidade Federal de São Paulo
Instituto do Mar - Imar
Campus Baixada Santista – Unidade Carvalho de Mendonça

Projeto Final de Conclusão de Curso
Biorremediação de Efluente de Indústria Alimentícia

Orientador: Prof. Dr. José Juan Barrera-Alba
Co-Orientador: Prof. Dr. Eduardo Dellosso Penteado
Discente: Thais de Oliveira Cornejo

Santos, 2019



Universidade Federal de São Paulo
Instituto do Mar - Imar
Campus Baixada Santista – Unidade Carvalho de Mendonça

Biorremediação de Efluente de Indústria Alimentícia

Monografia apresentada como requisito parcial de Conclusão de Curso para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Ambiental, sob orientação do Prof. Dr. José Juan Barrera-Alba e co-orientação do Prof. Dr. Eduardo Dellosso Penteado.

Thais de Oliveira Cornejo

Santos, 2019

Ficha catalográfica elaborada por sistema automatizado
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C813b de Oliveira Cornejo, Thais.
Biorremediação de Efluente de Indústria Alimentícia. / Thais de Oliveira Cornejo; Orientador José Juan Barrera-Alba; Coorientador Eduardo Dellosso Penteado. -- Santos, 2019.
37 p. ; 30cm

TCC (Graduação - Engenharia Ambiental) --
Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo, 2019.

1. Fitoplâncton. 2. Dunaliella salina. 3. Efluente de Laticínio. 4. Fitorremediação. 5. Cultivo de Microalgas. I. Barrera-Alba, José Juan, Orient. II. Dellosso Penteado, Eduardo, Coorient. III. Título.

CDD 628

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Universo por me proporcionar essa jornada de muito aprendizado ao lado de pessoas incríveis;

Ao meu orientador Prof. Dr. José Juan Barrera-Alba, que me deu apoio desde o início, guiando os passos e me orientando com muita sabedoria;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Eduardo Dellosso Penteado por se dispor a contribuir com o estudo;

Ao meu colega Marcos Vinícius Pereira Borges de Campos, que me proporcionou momentos de descontração, mas também de muito foco e compartilhamento de ideias e discussões para o estudo;

Ao Prof. Dr. Rodrigo Schweitzer e aos técnicos Fabrini e Natacha do Laboratório de Aquicultura da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pelo auxílio, estrutural e didático, durante as análises de nutrientes;

Ao Banco de Microrganismos Marinhos Aidar & Kutner (BMA&K) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP), pela doação das cepas das amostras da microalga *Dunaliella salina* (BMA&K 116) necessárias para o desenvolvimento dos experimentos;

À UNIFESP, professores, técnicos e demais membros, por terem sido responsáveis por tornar a jornada de aprendizado possível;

À minha família, por me apoiar e me incentivar na busca eterna por conhecimento e, principalmente ter gratidão ao Universo pelas conquistas. E à minha companheira, por estar ao meu lado e tornar a jornada mais reconfortante e feliz.

Sumário

Resumo	5
1.0 Introdução e Justificativa.....	6
2.0 Materiais e Métodos	13
2.1 Coleta do Efluente	13
2.2 Descrição da Cepa Seleccionada	13
2.3 Desenho Experimental.....	14
2.4 Controle do Crescimento dos Cultivos	15
2.5 Avaliação da Produção de Pigmentos.....	16
2.6 Caracterização dos Nutrientes Dissolvidos	17
3.0 Resultados e Discussão.....	18
3.1 Caracterização do Efluente.....	18
3.2 Crescimento dos Cultivos.....	19
3.3 Produção de Pigmentos	25
3.4 Caracterização dos Nutrientes Dissolvidos	29
4.0 Conclusão	31
5.0 Referências	33

Resumo

A crescente urbanização e industrialização acarreta maiores impactos ao meio ambiente e, conseqüentemente, maior geração de efluentes. A destinação incorreta destes no meio ambiente implica na eutrofização de corpos hídricos por compostos orgânicos e inorgânicos. O cultivo de microrganismos tem sido utilizado para tratamento de efluentes industriais, uma vez que podem apresentar crescimento relativamente rápido, assimilar nutrientes nocivos ao meio ambiente, e, além disso, servir como biomassa para produzir energia. No presente Projeto de Conclusão de Curso foi avaliado o cultivo de microalgas alimentadas com efluente produzido em uma fábrica de laticínios. O efluente foi caracterizado levantando-se parâmetros de nitrito e amônia, para posterior comparação com a remoção dos mesmos nutrientes nos cultivos. Cepas de microalgas clorófitas foram cedidas pelo Banco de Microorganismos Marinhos Aidar & Kutner (BMA&K) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP). A espécie de microalga *Dunaliella salina* (BMA&K 116) foi selecionada para os experimentos. Durante e após o cultivo foram analisados parâmetros de crescimento dos organismos utilizando-se o método de contagem por densidade celular e taxa de crescimento específica (μ) e taxa de duplicação celular (G). Análises dos pigmentos fotossintetizantes (Cl *a*, Cl *b* e carotenoides) no final dos experimentos também foram realizadas.

Palavras-chave: Fitoplâncton; *Dunaliella salina*; Efluente de Laticínio; Fitorremediação; Cultivo de Microalgas.

1.0 Introdução e Justificativa

Com o avanço da tecnologia e consequente crescimento populacional, a utilização e conservação dos recursos naturais de forma consciente se tornou um tema cada vez mais presente na sociedade. A poluição dos corpos hídricos é proveniente da industrialização e padrões de vida da sociedade, os quais também estão diretamente relacionados aos níveis econômicos da população (Goel, 1997). O Brasil é detentor de 12% da oferta de água do Planeta, contudo, apenas 4% é considerada de qualidade ótima (ANA, 2019). A qualidade da água é um tema muito questionado atualmente, não somente no Brasil como em todo o mundo, principalmente os baixos níveis de qualidade das fontes consideradas potáveis (ANA 2019).

A industrialização produz diversos tipos de efluentes e, quando não são devidamente tratados antes de serem despejados em corpos d'água, podem acarretar alterações no meio físico, químico e biológico (Schwarzenbach et al., 2010). Os processos comuns de tratamento primário e secundário de águas residuárias resultam num efluente claro e aparentemente limpo que muitas vezes é descarregado em corpos d'água naturais (Abdel-Raouf et al., 2012). No entanto, ele é carregado com nutrientes inorgânicos dissolvidos como nitrogênio e fósforo, podendo causar eutrofização a longo prazo devido a orgânicos refratários e metais pesados. Nesse caso, recomenda-se o tratamento terciário para remoção desses poluentes.

Segundo Von Sperling (2005), o tratamento de efluentes pode ser definido em quatro etapas que tem por objetivo:

- Tratamento preliminar: a remoção de sólidos mais grosseiros por meio de barreiras físicas por gradeamento e/ou caixas de areia;
- Tratamento primário: a remoção de sólidos flutuantes e sedimentáveis por flotação, decantação ou uso de peneiras;
- Tratamento secundário: a remoção de matéria orgânica ou em suspensão através de tratamento físico-químico e/ou reatores biológicos;

- Tratamento terciário: a remoção de nutrientes como nitrogênio e fósforo através de reatores biológicos, ou, ainda tratamento físico-químico.

No Brasil, assim como em outros países do mundo, existem leis ambientais que regulam o descarte de resíduos líquidos nos corpos d'água (classificados por lei) com o intuito de limitar a carga poluidora ao serem despejados na natureza. A Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011 (Ministério do Meio Ambiente), no âmbito nacional, classifica os corpos d'água e define outras diretrizes ambientais, além de estabelecer condições para o lançamento de efluentes. Conforme as Condições e Padrões de Lançamento de Efluentes, (Seção II, Art. 16) a carga de nitrogênio amoniacal contida em efluente que pode ser despejado diretamente em corpo receptor é de 20,0 mg.L⁻¹. Ainda, de acordo com a Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005 (Ministério do Meio Ambiente) o efluente a ser despejado em águas doces de classe 1 devem ter os padrões abaixo de nitrogênio e fósforo:

- Nitrato 10,0 mg/L;
- Nitrito 1,0 mg/L;
- Nitrogênio amoniacal total:
 - 3,7mg/L, para pH ≤ 7,5;
 - 2,0 mg/L, para 7,5 < pH ≤ 8,0;
 - 1,0 mg/L, para 8,0 < pH ≤ 8,5;
 - 0,5 mg/L, para pH > 8,5.
- Fósforo total (ambiente lântico) 0,020 mg/L;
- Fósforo total (ambiente intermediário, com tempo de residência entre 2 e 40 dias, e tributários diretos de ambiente lântico) 0,025 mg/L;

As microalgas são microrganismos fotossintéticos unicelulares capazes de converter facilmente a energia solar em energia química, que podem ser aproveitadas para posterior extração e aproveitamento da bioenergia, biomassa e de produção de produtos de aplicação comercial; além de remover poluentes provenientes de águas residuárias (Cardoso et al., 2011; Christenson & Sims, 2011). O cultivo de microalgas alimentadas por efluentes contendo nutrientes e poluentes resulta em seu crescimento,

para posterior extração e aproveitamento na aplicação de produtos diversos (Umamaheswari & Shanthakumar, 2016) como alimentos, ração animal, cosméticos e matéria-prima para a indústria química (Lamers et al., 2008).

Algumas vantagens na utilização de microalgas para tratamento de efluentes são: (1) Crescem em qualquer meio, doce ou salgado; (2) Podem assimilar nutrientes das águas residuárias e utilizar como suplemento de crescimento; (3) Requerem menos água do que em culturas terrestres e são capazes de produzir durante o ano todo (Umamaheswari & Shanthakumar, 2016).

Segundo Ruiz et al. (2016) atualmente, o mercado da produção de componentes de valor agregado produzido por microalgas se encontra mais lucrativo no setor alimentício, em que os pigmentos são matéria-prima para produção de aditivos alimentares; e de cosméticos. Ainda, tendo em vista que existe uma tendência mundial dos consumidores procurarem por mais produtos de origem natural, encontra-se uma oportunidade para o mercado de aditivos alimentares das microalgas. Por outro lado, alguns mercados como o de biocombustíveis não se encontra aquecido por não conseguir competir com o atual de combustíveis fósseis (Ruiz et al, 2016).

Indústrias de derivados do leite, avicultura, papel, tecidos e de processos de destilação contém efluentes ricos em nutrientes e CO₂. O tratamento com algas é um método efetivo para tratar ou bioremediar efluentes industriais com altas concentrações de nitrogênio (N) e fosfato (P) (Umamaheswari & Shanthakumar, 2016). Adicionalmente, algumas espécies de microalgas são capazes de assimilar contaminantes tóxicos.

Kothari et al. (2013) mostraram num estudo de tratamento com microalgas a remoção de mais de 60% de nutrientes e 65% de poluentes em um efluente de derivados de leite. Nesse estudo foi utilizada a espécie *Chlamydomonas polypyrenoideum* e o cultivo foi mantido por cerca de 15 dias em frascos fechados com fotoperíodo controlado. A produção de biomassa após 10 dias de tratamento demonstrou 42% de lipídeos com alta capacidade de utilização para produção de biodiesel. Kotteswari et al. (2012) realizaram um estudo com *Nostoc sp.* cultivada em frascos com efluente de derivados de leite, se mostrando uma alternativa importante de tratamento terciário para remover

nutrientes. Farooq et al. (2013) também registraram uma remoção de >80% de nutrientes de efluentes de cerveja utilizando *Chrorella* sp.

O cultivo de microalgas pode ser feito por meio de fotobiorreatores abertos (tanques aerados, lagoas) ou fechados (tubular, reator em placa, etc). Os sistemas de fotobiorreatores fechados são mais adequados para espécies que podem ser facilmente contaminadas por outros microrganismos. Existe um conhecimento limitado a respeito dos custos de operação e sistemas de cultivo de microalgas, especialmente em fotobiorreatores fechados (Ruiz et al. 2016). No entanto, águas residuárias podem ser utilizadas como alimentação dos sistemas abertos ou fechados, desde que sejam ricas em nutrientes como nitrogênio, fósforo, carbono, entre outros (Cardoso et al., 2011).



Figura 1. Esquema de fotobiorreator fechado (A) – tubos horizontais – e aberto (B) – sistema raceways. (Fonte: <https://brasilescola.uol.com.br/quimica/biodiesel-algas.htm>; <http://galpemur.es/?portfolio-item=cultivo-de-microalgas-en-zona-continental>; acesso em 11/11/2019)

O tratamento de águas residuárias adotado pela fábrica de laticínios envolvida neste estudo é dividido em duas etapas: processo físico-químico e processo biológico e, posteriormente, o efluente tratado é despejado no corpo hídrico mais próximo, atendendo as normas de padrão de qualidade de efluente vigentes (CONAMA nº 430).

De acordo com as informações fornecidas pela própria fábrica de laticínios, segue abaixo a descrição do tratamento na Planta de Tratamento de Águas Residuárias (PTAR) que ocorre na mesma (Figura 2):

1. As águas residuárias são armazenadas em um tanque de equilíbrio, com o objetivo de controlar a flutuação de vazão da fábrica, e absorver as variações das características físico-químicas do efluente;
2. O efluente é bombeado para um tanque de flotação para realizar a separação das partículas líquidas e sólidas, para eliminação de material suspenso e redução da concentração de gorduras;
3. Após o tratamento físico-químico no tanque de equilíbrio e flotador o efluente segue para o tratamento em seis tanques de aeração. Os tanques fazem a digestão do efluente através do crescimento de bactérias e formação de lodo;
4. Na última etapa do tratamento o efluente passa por um clarificador com o objetivo de remover as impurezas que podem ter restado ao final do tratamento.

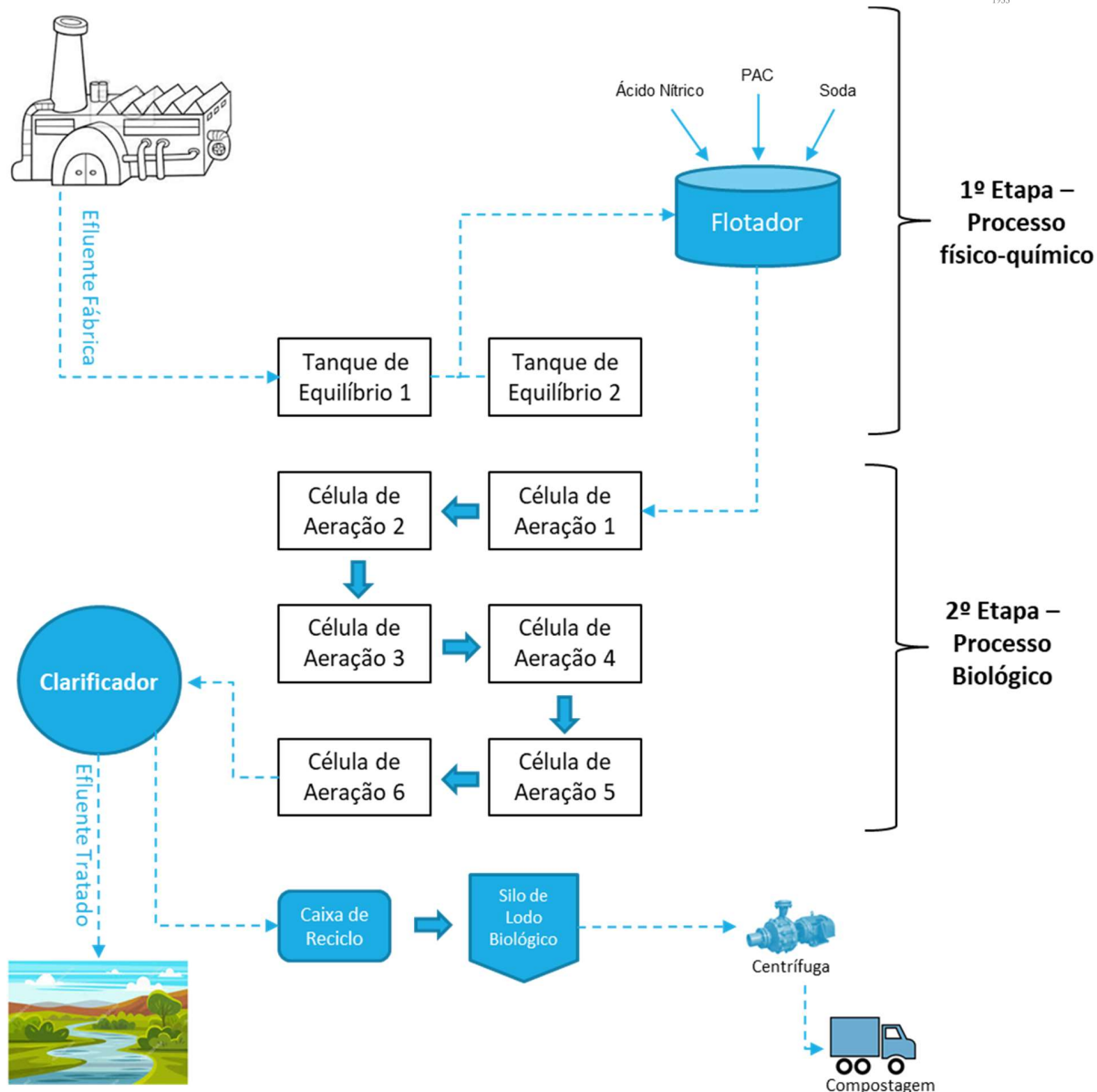


Figura 2. Fluxograma do tratamento na PTAR da fábrica de laticínios. (Fonte: Fluxograma adaptado da fábrica de laticínios; Imagens Fábrica - <https://myloview.com.br/fotomural-fabrica-preto-e-branco-dos-desenhos-animados-no-F02ECF>; Córrego d'água - <https://br.depositphotos.com/181211898/stock-illustration-cartoon-landscape-with-mountains-river.html>; Centrífuga - <https://www.gratispng.com/png-ydhav5/> e Caminhão - <https://myrealdomain.com/explore/caminhao-desenho-png.html>; acesso em 11/11/2019)

O crescimento dos organismos em culturas de microalgas pode ser estimado ou determinado por métodos como contagem de células, densidade ótica, fluorescência *in*

vivo, quantificação do peso seco, concentração de pigmentos (principalmente clorofila *a*), concentração de carbono, etc. (Lourenço, 2006).

A contagem é o método mais utilizado, por ser fundamental para a compreensão da dinâmica de crescimento dos cultivos. (Lourenço, 2006). Mata et al. (2010) diferenciam cinco fases de crescimento no cultivo microalgas (1) lag; (2) exponencial; (3) linear; (4) estacionária; (5) declínio ou morte. A fase *lag* ocorre quando os organismos inoculados sofrem estresse em novas condições ambientais como pH, temperatura, concentração de nutrientes, etc. (Andersen, 2005). Durante a fase exponencial a multiplicação celular é mais constante e intensa, havendo melhor adaptação dos organismos ao meio de cultivo (Andersen, 2005). A partir daí iniciam-se a fase linear e estacionária, marcadas pela estabilização do crescimento exponencial e até redução no número de células durante a fase de declínio.

O pigmento clorofila *a* (Cl *a*) é o principal mecanismo de absorção de luz para a fotossíntese nos organismos fitoplancônicos (Andersen, 2005). Assim, a Cl *a* é utilizada para determinar a biomassa e produtividade do fitoplâncton. Outros pigmentos acessórios como clorofila *b* (Cl *b*) e carotenóides são importantes na fotossíntese, atuando como extensores de absorção de luz para os organismos, assim como prevenção de danos celulares sob altas irradiações (fotoproteção) (Anderden, 2005).

O presente trabalho pretende avaliar uma alternativa de tratamento de efluente de indústria alimentícia utilizando microalgas como assimiladoras de nutrientes inorgânicos. O estudo utilizou uma cepa da espécie de microalga *Dunaliella salina* (BMA&K 116) cedida pelo Banco de Microorganismos Marinhos Aidar & Kutner (BMA&K) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP). O cultivo foi realizado em frascos abertos alimentados por águas residuárias de uma fábrica de laticínios. A eficiência da fitorremediação sob diferentes concentrações do efluente foi testada comparando-se o crescimento dos cultivos, as concentrações iniciais e finais de nutrientes dissolvidos (nitrito e nitrogênio amoniacal), e concentrações de pigmentos (Cl *a*, Cl *b* e carotenoides).

2.0 Materiais e Métodos

2.1 Coleta do Efluente

O efluente foi coletado no tanque de equilíbrio 1 (Figura 2) da PTAR de uma fábrica de laticínios antes de ser aplicado o tratamento na própria unidade. Foram utilizados dois efluentes: efluente 1 (EFLU1) e efluente 2 (EFLU2).

2.2 Descrição da Cepa Seleccionada

Os experimentos foram realizados com uma cepa da microalga *Dunaliella salina* (BMA&K 116) cedida pelo Banco de Microorganismos Marinhos Aider & Kutner (BMA&K) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP). A cepa foi mantida numa câmara de cultivo com meio f/2 (Guillard & Ryther, 1962), com temperatura de 20°C e fotoperíodo 14 horas luz:10 horas escuridão (14:10).

O gênero *Dunaliella* é constituído por microalgas unicelulares, fotossintetizantes, possuem dois flagelos motores e são morfologicamente distintas pela falta de uma parede celular rígida (Tafreshi & Shariati, 2009). As células de *Dunaliella* se adaptam a uma ampla concentração de salinidade e temperatura (5° a 40°), pois são capazes de alterar sua concentração intracelular de glicerol, respondendo a choques hiperosmóticos para regular a osmorregulação (Tafreshi & Shariati, 2009; Tinoco et al, 2015). O glicerol funciona como um “soluto compatível” protegendo as enzimas contra inativação e inibição, contudo, o glicerol é eliminado quando ocorrem choques hiposmóticos. Assim, a quantidade de glicerol produzida e pigmentos (principalmente carotenoides) é proporcional à concentração salina no meio extracelular (Tafreshi & Shariati, 2009; Tinoco et al., 2015).

2.3 Desenho Experimental

No primeiro experimento, *D. salina* foi cultivada, durante 20 dias, em frasco de 250 mL (E1T1). Para testar a capacidade de crescimento da microalga no efluente selecionado foi utilizada uma concentração de 50% do EFLU1 em água do mar, com temperatura de 20°C e fotoperíodo de 14 horas luz:10 horas escuridão (14:10).

Posteriormente, no segundo experimento foi testado o crescimento de *D. salina* em porcentagens menores de efluente, pois a elevada turbidez do mesmo poderia afetar ao desenvolvimento da microalga. Para tal, as culturas foram submetidas a porcentagens de 20 e 30 % de efluente e mantidas durante 15 dias e mesmas condições de temperatura e fotoperíodo do experimento anterior. As alíquotas do tratamento foram submetidas, em triplicata, a concentrações de 20% (E2T1) e 30% (E2T2) do EFLU2 em frascos de 100 mL. As alíquotas de controle foram submetidas, em triplicata, a concentrações de 20% (E2C1) e 30% (E2C2) de água destilada (AD) em frascos de 100 mL em meio f/2 (Guillard & Ryther, 1962).

No terceiro experimento de cultivo foi testado se a adição de macro e micronutrientes (vitaminas e metais traços) estimulava o crescimento de *D. salina* em presença do efluente. Para tal foi as culturas foram incubadas com 20% do EFLU2 para todos os três tratamentos. Sendo cada um dos tratamentos realizados em triplicata, em um tratamento não foi adicionado nenhum micronutriente (E3T1); em outro tratamento com 20% do EFLU2 foi enriquecido com solução de vitaminas e metais; e por último um tratamento com 20% do EFLU2 enriquecido com solução de vitaminas, metais e fosfato – mesmas condições de temperatura e fotoperíodo (E3T3). As alíquotas foram cultivadas em frascos de 250 mL durante 17 dias.

Todas as coletas foram feitas diariamente, com exceção de finais de semana ou dias de impossibilidade de coleta, e fixadas com lugol para posterior contagem das células. Abaixo a Tabela 1 com a síntese dos tratamentos realizados:

Tabela 1. Tratamentos e Controles realizados no experimento 1 (E1), experimento 2 (E2) e experimento 3 (E3) durante o estudo. Controle (C1, C2), Tratamentos (T1, T2, T3), Efluente 1 (EFLU1), Efluente 2 (EFLU2), Água destilada (AD), f/2 - Meio f/2 (Guillard & Ryther, 1962)

Tratamento	Dias	Meio e Nutrientes	Concentração	Efluente
E1T1	20	-	50%	ELU1
E2C1	15	f/2	20%	AD
E2T1	15	-	20%	EFLU2
E2C2	15	f/2	30%	AD
E2T2	15	-	30%	EFLU2
E3T1	17	-	20%	EFLU2
E3T2	17	vitaminas e metais	20%	EFLU2
E3T3	17	vitaminas e metais + fosfato	20%	EFLU2

2.4 Controle do Crescimento dos Cultivos

O crescimento dos cultivos foi determinado por contagem do número de células para cálculo da densidade celular (células.mL⁻¹). Utilizou-se câmaras de Neubauer para contar as amostras em um Microscópio Binocular Modelo ZEISS.

A contagem de cada amostra foi feita nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer. Assim, para obter o número de células.mL⁻¹ foi utilizada a fórmula abaixo:

$$n^{\circ} \text{ de células por mL} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times 10.000$$

Cada quadrante da câmara possui 0,1 mm³; assim, para obtermos 1 mL temos que dividir o valor correspondente a 1 mL (1.000 mm³) por 0,1 mm³ (ou multiplicar por 10.000). Foram calculadas as densidades celulares para cada amostra/réplica e para cada tipo de tratamento foram calculadas: Densidade Inicial (DI); Densidade Final (DF) e Densidade Máxima (DM); para o cálculo da DM representou-se o resultado com o desvio padrão das réplicas.

Em estatística, o logaritmo natural (ou número neperiano) pode ser utilizado na modelagem do crescimento exponencial de organismos. Isso é possível, pois ele permite

modelar dados em um padrão curvo pela regressão linear simples, aproximando os dados para formar uma reta (Andersen, 2005). O ln foi utilizado em populações de microalgas para demonstrar o crescimento de culturas em Santos (2006) no cultivo de *Acutodesmus obliquus* e em Candido (2015) no cultivo de *Chlorella vulgaris*.

Para a determinação da densidade ótica determinou-se o tempo de duplicação celular ($G \text{ d}^{-1}$) e a taxa de crescimento específica ($\mu \text{ d}^{-1}$) a partir do logaritmo natural ln (células.mL⁻¹) da fase exponencial de cada cultivo, ambos baseados nas fórmulas apresentadas por Fogg & Thake (1987), descritas em Andersen (2005):

$$G = \frac{\ln 2}{\mu}$$
$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{t - t_0}$$

Onde:

μ é a velocidade específica de crescimento;

G é o tempo de duplicação celular, calculado a partir de μ ;

N_0 é o número inicial de células.mL⁻¹ no tempo inicial t_0 ;

N é o número final de células.mL⁻¹ no tempo t.

2.5 Avaliação da Produção de Pigmentos

Para determinação da concentração dos pigmentos fotossintetizantes, primeiramente filtrou-se 50 mL de amostra em filtros de fibra de vidro (0,7 μm). Os filtros foram congelados e preservados a -20°C até a análise. Para análise, os filtros foram colocados em 10 mL de acetona (90%), macerados e deixados para extrair pigmento no escuro a 4°C por 24 horas. Posteriormente, realizou-se uma leitura óptica da absorbância de cada amostra nos comprimentos de ondas (480, 510, 630, 647, 664, 750 nm; e 664 e 750 nm acidificado) em espectrofotômetro. A concentração dos pigmentos foi calculada

de acordo com as equações descritas em Lorenzen (1967), Jeffrey & Humphrey (1975) e Parsons et al. (1984).

$$Cl\ a\ (mg.m^3) = [11,85 * A(664) - 1,54 * A(647) - 0,08 * A(630)] * [V_a / (V_f * L)]$$

$$Cl\ b\ (mg.m^3) = [21,03 * A(647) - 5,43 * A(664) - 2,66 * A(630)] * [V_a / (V_f * L)]$$

$$Carotenóides\ (mg.m^3) = [7,6 * A(480) - 1,49 * A(510)] * [V_a / (V_f * L)]$$

Onde:

A() é a absorbância no respectivo comprimento de onda;

V_a é o volume da acetona;

V_f = volume filtrado da amostra.

2.6 Caracterização dos Nutrientes Dissolvidos

Para caracterização dos parâmetros nitrito e nitrogênio amoniacal dissolvidos foram feitas coletas do efluente bruto no início e final de cada experimento, após passar pelo tratamento com microalgas. As amostras foram filtradas (Seção 2.4) e o que foi filtrado foi congelado para análise dos parâmetros mencionados acima.

A curva de calibração para o nitrito dissolvido foi feita utilizando o método de Bendschneider & Robinson (1952), descrito em Baumgarten et al. (1996), a qual emprega solução acopladora (N-(1-naftil) etilenodiamino) e solução de Sulfanilamida (NH₂-SO₂O₆H₄NH₂) como reagentes. Para determinação do nitrato foi utilizado o método de

Grasshoff et al. (1983), no qual a redução do nitrato a nitrito é realizada através de uma coluna redutora composta por grãos de cádmio (solução cúprica).

A concentração de nitrogênio amoniacal foi realizada pelo método de Koroleff (1969), descrito em Grasshoff et al. (1983), o qual emprega nitroprussiato de sódio ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$) e fenol + álcool ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) como reagentes e citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) como solução oxidante.

3.0 Resultados e Discussão

3.1 Caracterização do Efluente

Nesta seção, discute-se os resultados fornecidos pela fábrica de laticínios, referente às concentrações iniciais de nutrientes no efluente, ou seja, antes de proceder para o tratamento na PTAR. Adicionalmente, os resultados obtidos neste estudo na caracterização dos parâmetros de nitrito e nitrogênio amoniacal e fosfato também estão representados. A seção 3.4 contém os resultados após o tratamento deste estudo.

Os resultados fornecidos pela fábrica são valores referentes a uma coleta qualquer, a qual não foi a mesma utilizada neste estudo. Como também foi informado pela fábrica, esses resultados são analisados/refeitos periodicamente, para avaliar as concentrações de substâncias orgânicas e inorgânicas compostas no efluente proveniente da produção de laticínios. A temperatura do efluente inicial é de 31°C, pH 6,83 e vazão média 490 $\text{m}^3\cdot\text{dia}^{-1}$. Após o tratamento, as concentrações finais de nitrogênio total são 0,224 e de fósforo total <0,1.

Adicionalmente, nesse estudo, os resultados das concentrações iniciais de nutrientes no EFLU2 foram: 1,02 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrito e 1,31 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrogênio amoniacal. Nota-se que são concentrações menores do que foram utilizadas na literatura. Kothari et al.

(2013) utilizou a espécie de microalga *C. polypyrenoideum* em concentrações iniciais de 5,03 mg.L⁻¹ nitrito, 78,31 mg.L⁻¹ nitrato, 18,45 mg.L⁻¹ amônia e 5,58 mg.L⁻¹ fosfato.

Tendo em vista que o efluente sofre flutuações na concentração de nutrientes, devido à mudanças na produção, como por exemplo, maior utilização de alimentos orgânicos para confecção dos produtos lácteos, entende-se a origem das diferenças dos dados fornecidos pela fábrica e os resultados analisados neste experimento.

3.2 Crescimento dos Cultivos

O experimento 1 teve como objetivo verificar que a *D. salina* tinha capacidade de se desenvolver no efluente selecionado. A cultura teve uma fase de aclimação (*lag*) longa, que durou até o dia 10, em que as células começaram crescer (Figura 3). O crescimento tardio da cultura pode ser correlacionado com a adaptação de *D. salina* às características do efluente. Dos dias 10 ao 18 (fase exponencial), a cultura E1T1 apresentou uma taxa $\mu = 0,75 \text{ d}^{-1}$. A elevada duração da fase de aclimação observada no primeiro experimento pode ter sido devido o efluente apresentar uma elevada turbidez, provocando uma limitação por luz da *D. salina*. Em vista desses resultados, nos seguintes experimentos foi utilizada uma porcentagem de efluente menor que 50% para verificar se a fase de aclimação poderia ser reduzida diminuindo a turbidez das culturas.

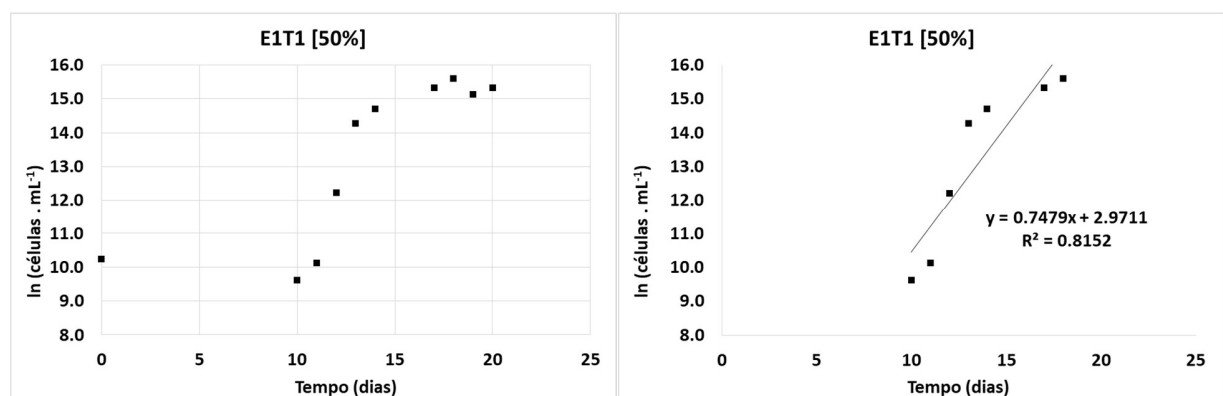


Figura 3. Curva e Taxa de Crescimento Específica $\ln (\text{células}.\text{mL}^{-1})$ por período de tempo (dias). Cultivo E1T1 em concentração 50% do EFLU1.

Durante o experimento 2 analisou-se a resposta dos cultivos com porcentagens do EFLU2 de 20 e 30%, o qual foi coletado em uma data mais próxima dos experimentos. Nas Figura 4 e 5, são apresentadas as curvas e taxas de crescimento desse experimento:

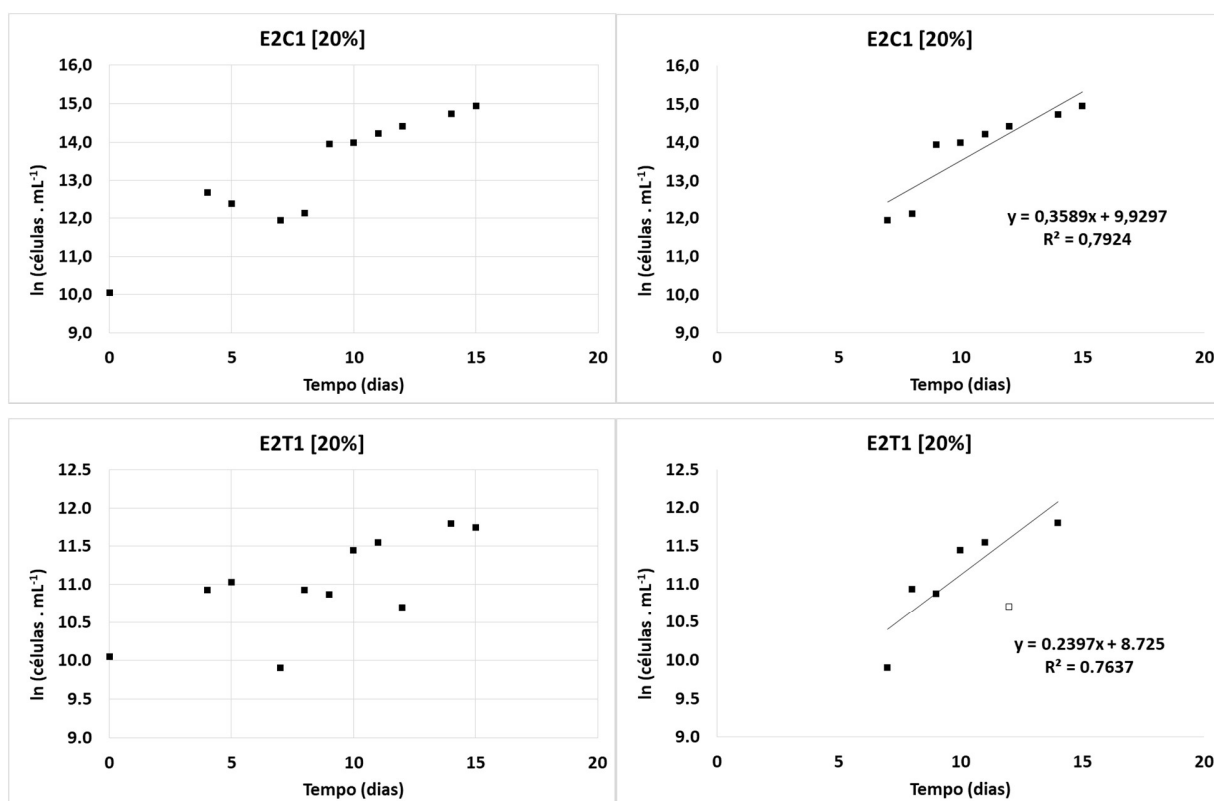


Figura 4. Curva e Taxa de Crescimento Específica $\ln(\text{células.mL}^{-1})$ por período de tempo (dias). Cultivo controle E2C1 em concentração 20% de AD e cultivo E2T1 em concentração 20% do EFLU2.

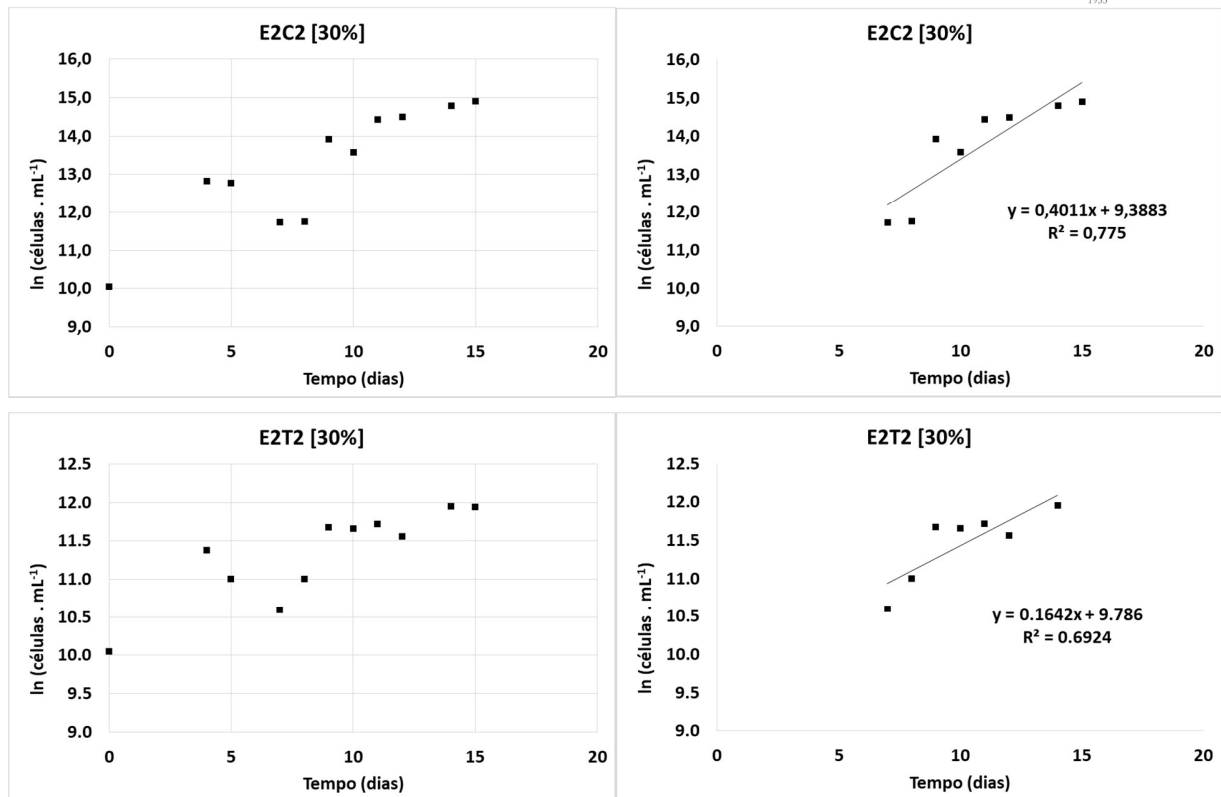


Figura 5. Curva e Taxa de Crescimento Específica $\ln(\text{células.mL}^{-1})$ por período de tempo (dias). Cultivo controle E2C2 em concentração 30% de AD e cultivo E2T2 em concentração 30% do EFLU2.

As fases lag de E2C1, E2T1, E2C2 e E2T2 foram até o dia 7 e as fases exponenciais do dia 7 ao 14. Os tratamentos apresentaram taxas $\mu = 0,24 \text{ d}^{-1}$ e $\mu = 0,16 \text{ d}^{-1}$ (E2T1 e E2T2) menores que os controles com $\mu = 0,36 \text{ d}^{-1}$ e $\mu = 0,40 \text{ d}^{-1}$ (E2C1 e E2C2). Os tratamentos com 20 e 30% de EFLU2 atingiram densidades similares entre si ($1,33 \times 10^5 \pm 0,30 \text{ células.mL}^{-1}$ e $1,55 \times 10^5 \pm 0,42 \text{ células.mL}^{-1}$), contudo a taxa μ foi maior no tratamento de 20% ($\mu = 0,24 \text{ d}^{-1}$) do que no de 30% ($\mu = 0,16 \text{ d}^{-1}$). Os cultivos do experimento 2 foram compilados na Figura 6, no qual se observa a diferença na curva de crescimento dos tratamentos e controles durante os 15 dias de cultivo.

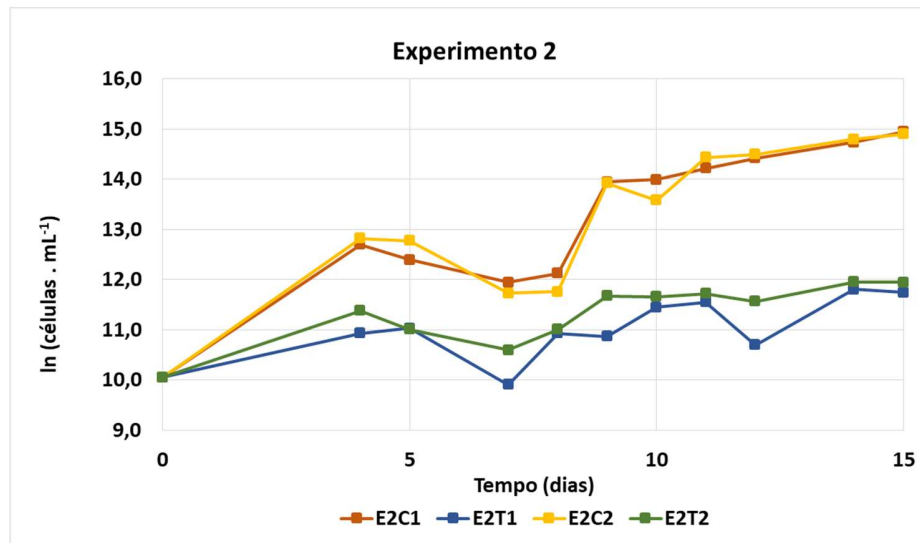


Figura 6. Curva de Crescimento ln (células.mL⁻¹) por período de tempo (dias). Cultivos controles E2C1 e E2C2 em concentração 20% e 30% de AD e cultivos E2T1 e E2T2 em concentração 20% e 30% de EFLU2.

Na preparação das alíquotas do experimento 3 foi inoculado o cultivo de *D. salina* do experimento 2, uma vez que a microalga já estava adaptada às condições de salinidade e nutrientes do efluente. A resposta dos cultivos com 20% de concentração do EFLU2 foi analisada, sendo que um dos tratamentos foi preparado sem a adição de nutrientes (E3T1). Na Figura 6 são apresentadas as curvas e taxas de crescimento desse experimento.

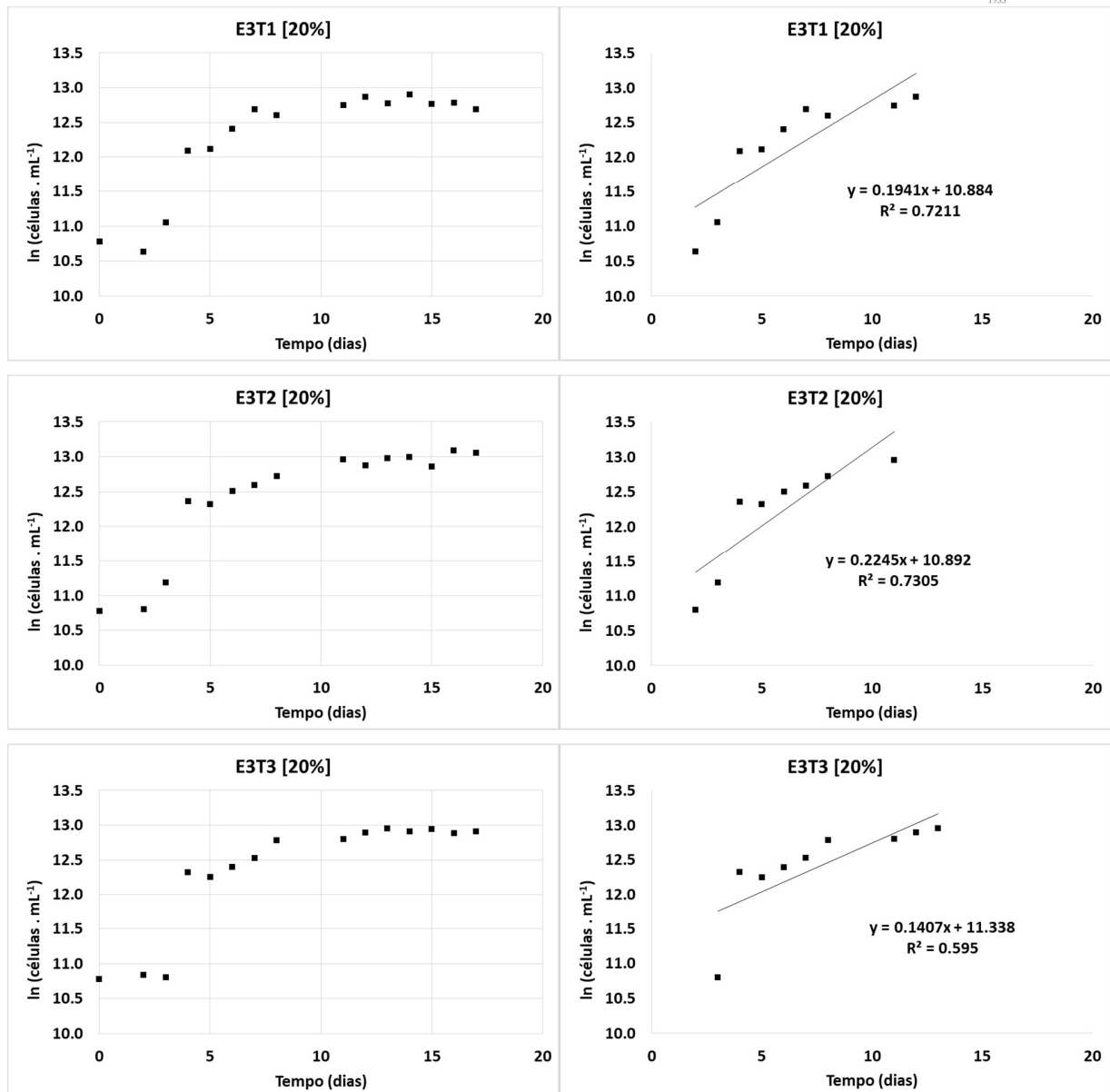


Figura 7. Curva e Taxa de Crescimento Específica $\ln(\text{células} \cdot \text{mL}^{-1})$ por período de tempo (dias). Cultivos E3T1, E3T2 e E3T3 em concentração 20% do EFLU2.

As fases exponenciais de E3T1, E3T2 e E3T3 iniciaram entre os dias 2 e 3 de cultivo. E3T2 apresentou a maior taxa $\mu = 0,22 \text{ d}^{-1}$, E3T1 taxa $\mu = 0,19 \text{ d}^{-1}$ e E3T3 taxa $\mu = 0,14 \text{ d}^{-1}$. O E3T2 apresentou também a maior densidade máxima ($4,85 \times 10^5 \pm 0,48 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$) (Tabela 2).

Os cultivos do experimento 3 foram compilados na Figura 7, no qual se observa pequenas diferenças na curva de crescimento dos tratamentos durante os 17 dias de cultivo. O tratamento 2 com adição de vitaminas e metais, foi o que apresentou melhores resultados de crescimento quando comparados ao 1, sem adição de nutrientes e ao 3, com adição de vitaminas, metais e fosfato. As concentrações relativas de nutrientes necessárias para que um nutriente esteja disponível e não seja limitante é 16:1 N:P (Andersen, 2005). Dessa forma, a adição de fosfato no tratamento 3 pode ter desbalanceado essa proporção e tornado algum nutriente limitante.

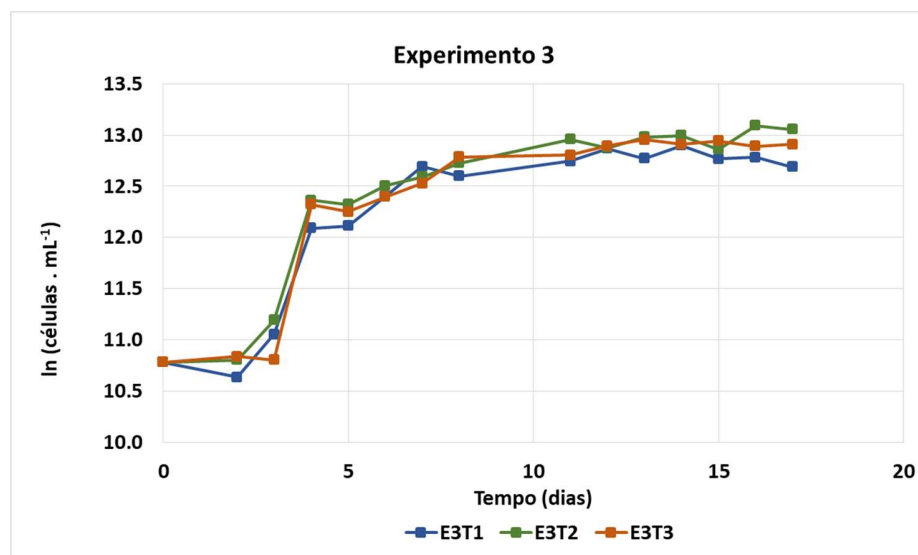


Figura 8. Curva de Crescimento ln (células.mL⁻¹) por período de tempo (dias). Cultivos experimento 3 com 20% do EFLU2.

A compilação dos resultados de crescimento de todos os cultivos estão representados na Tabela 2 e curvas de crescimento na Figura 8. A resposta do E1T1 foi mais tardia ao início do crescimento de células (dia 10), contudo a densidade máxima ($59,55 \times 10^5$ células.mL⁻¹) atingida foi maior, no 18 dia do experimento.

Quando se observa a evolução das curvas de crescimento do experimento 2, os controles E2C1 e E2C2 atingiram densidades similares no dia 14 ($30,78 \times 10^5$ células.mL⁻¹ e $26,55 \times 10^5$ células.mL⁻¹) em relação ao E1T1 ($24,15 \times 10^5$ células.mL⁻¹) (Figura 5).

Os tempos de duplicação celular foram menores no experimento 1, indicando que foi necessário um menor número de dias ($G = 0,92 \text{ d}^{-1}$) para que o cultivo duplique o número de células durante a fase exponencial de crescimento. No segundo experimento, os controles apresentaram menores G ($E2C1 = 1,93 \text{ d}^{-1}$ e $E2C2 = 1,73 \text{ d}^{-1}$) que os tratamentos ($E2T1 = 2,89 \text{ d}^{-1}$ e $E2T2 = 4,33 \text{ d}^{-1}$), indicando que nesses últimos foi necessário um tempo maior para a duplicação do número de células do cultivo. No terceiro experimento, é possível observar que no tratamento 2 o tempo de duplicação também foi melhor, menor que os demais ($G = 3,15 \text{ d}^{-1}$).

Tabela 2. Resultados de crescimento dos cultivos.*Não foi feito o desvio padrão dessa amostra, pois o experimento foi feito com uma réplica. Os demais foram feitos em triplicata.

Amostra	Crescimento					
	Densidade Inicial (DI) [($\times 10^5$) células.mL ⁻¹]	Densidade Máxima (DM) [($\times 10^5$) células.mL ⁻¹]	Tempo DM [dias]	Início Fase Exponencial [dias]	Taxa de Crescimento Específica μ [d ⁻¹]	Tempo de Duplicação Celular G [d ⁻¹]
E1T1* [50%]	0,278	59,55	18	10	0,75	0,92
E2C1 [20%]	0,232	30,78 \pm 4,60	15	7	0,36	1,93
E2T1 [20%]	0,232	1,33 \pm 0,30	14	7	0,24	2,89
E2C2 [30%]	0,232	29,58 \pm 3,15	15	7	0,40	1,73
E2T2 [30%]	0,232	1,55 \pm 0,42	14	7	0,16	4,33
E3T1 [20%]	0,481	4,00 \pm 0,09	14	2	0,19	3,65
E3T2 [20%]	0,481	4,85 \pm 0,48	16	2	0,22	3,15
E3T3 [20%]	0,481	4,23 \pm 0,43	13	3	0,14	4,95

3.3 Produção de Pigmentos

Os pigmentos produzidos nos cultivos são os componentes mais essenciais na biomassa das microalgas (Ruiz et al., 2016). No caso de pigmentos naturais, que são mais vendidos nas formas de b-caroteno, luteína e astaxantina, o mercado mundial estimado é de 1,0 bilhão de dólares, o qual corresponde à uma produção de 1.000 ton por ano de biomassa de microalgas (Ruiz et al, 2016). Contudo, a produção de 183 ton produzida em 100 hectares ainda está um pouco longe de atingir esse mercado (Ruiz et al, 2016).

Da Fré (2016) e Tafreshi & Shariati (2009) descreveram a espécie *D. salina* como a melhor fonte de extração natural de β -caroteno. Carotenoides nas formas α e β -caroteno, violaxantina, neoxantina, zeaxantina e luteína podem ser acumulados em suas células (Tafreshi & Shariati, 2009). *D. salina* acumula grandes quantidades de β -caroteno em gotículas armazenadas nos cloroplastos, fornecendo maior proteção à clorofila em condições de cultura com altas intensidades de luz, elevada temperatura e salinidade, e deficiência de nutrientes (Tafreshi & Shariati, 2009).

Segundo a Embrapa (2019), o conceito de biorrefinaria se resume à processos integrados que convertem biomassa em: biocombustíveis, componentes químicos, alimentos, rações animais e energia. Adicionalmente, o seu objetivo, como outros processos na indústria é otimizar a utilização de recursos/matéria-prima e reduzir a produção de efluentes/resíduos. No caso do cultivo de microalgas não é diferente, uma vez que a estratégia do processo de biorrefinaria depende do componente a ser extraído para um determinado produto (Ruiz et al., 2016), resultando em mercados citados anteriormente: biocombustíveis, alimentação animal, aditivos alimentares e cosméticos.

A aplicação de carotenoides é em grande parte na alimentação animal, contudo devido às suas propriedades antioxidantes e fonte de vitamina A, é fortemente empregada como complexo alimentar nas indústrias alimentícias (Tinoco et al., 2015).

Conforme observado na Tabela 3, o experimento E1T1 apresentou maior concentração de pigmentos para Cl *a*, Cl *b* e carotenoides. Por problemas logísticos não foram realizadas as coletas de pigmentos do experimento 2. Entre os tratamentos do terceiro experimento o E3T2, apresentou maior teor de Cl *a* e Cl *b* (195,2 mg.m³ e 32,5 mg.m³); enquanto E3C1 apresentou maior concentração de carotenoides (291,3 mg.m³). García-González et al. (2002) registraram valores de até 15.100 mg.m⁻³ e $\mu = 0,20 \text{ d}^{-1}$ com *D. salina* (UTEX) em um estudo utilizando cultivos em batelada ao ar livre.

Tabela 3. Resultados da Concentração de Pigmentos Finais dos experimentos 1 e 3. E1T1 coletado no 20º dia; E3T1, E3T2, E3T3 coletados no 17º dia.

Amostra	Pigmentos (mg.m ³)		
	Clo <i>a</i>	Clo <i>b</i>	Carotenoides
E1T1 [50%]	674,5	122,8	742,2
E3T1 [20%]	134,5	10,7	234,3
E3T2 [20%]	195,2	32,5	274,0
E3T3 [20%]	168,4	16,6	291,3

A razão de pigmentos acessórios como Cl *b* e carotenoides pela Cl *a* é um fator importante para determinação do acúmulo de pigmentos nas células do cultivo, uma vez que a Cl *a* é o pigmento principal de organismos fotossintetizantes (Andersen, 2005). Ainda, o estresse provocado por condições de cultivo como: iluminação excessiva, salinidade e temperatura é decisivo na alteração da concentração de pigmentos durante o cultivo, resultando em um aumento da proporção carotenóide / clorofila (Koller et al., 2014).

A Tabela 4 contém as razões de pigmentos acessórios, Cl *b* e carotenoides por Cl *a*. O cultivo E1T1 apresentou a maior razão Cl *b* / Cl *a* (0,18 g.g⁻¹), contudo, a menor razão Carotenoides / Cl *a* (1,10 g.g⁻¹). Dentre os tratamentos com 20% nota-se que no cultivo E2T2 obteve-se uma maior razão de Cl *b* / Cl *a*, contudo, menor razão na produção de carotenoides por Cl *a*. Dessa forma, o enriquecimento com fosfato e micronutrientes (E3T3) demonstrou uma eficiência similar na produção de pigmentos acessórios por Cl *a* quando se compara a nenhuma adição de nutrientes (E3T1).

Tabela 4. Resultados da Razão de Cl *b* e Carotenoides por Cl *a* dos experimentos 1 e 3.

Amostra	g.g ⁻¹	
	Cl <i>b</i> / Cl <i>a</i>	Carotenoides / Cl <i>a</i>
E1T1	0,18	1,10
E3T1	0,08	1,74
E3T2	0,17	1,40
E3T3	0,10	1,73

Conforme pode-se observar na Tabela 5, apesar de apresentar os valores mais altos de densidade e pigmento, o E1T1 apresentou baixas razões Cl *a* / DF (1,48 x10⁻⁵

g.célula⁻¹) e CI *b* / DF (0,39 x10⁻⁵ g.célula⁻¹). Segundo Tinoco et al. (2015), a produção e acumulação de β-caroteno em microalgas varia de acordo com fatores de luminosidade, salinidade, temperatura ou disponibilidade de nutrientes, podendo reduzir a densidade celular por afetarem a viabilidade celular. Tais apontamentos podem ser observados também nos resultados da Figura 9, em que a redução de carotenoides por célula foi inversamente proporcional à densidade máxima atingidas nos cultivos.

No experimento 3, os maiores valores intracelulares de carotenoides foram em E3T1 (0,724 pg.célula⁻¹) e E3T3 (0,715 pg.célula⁻¹), sendo que no tratamento 1 não houve adição de vitaminas, metais e fosfato. O tratamento 2, que mostrou os melhores resultados de densidade foi o que apresentou menores razões de pigmento por nº de células (CI *a* / DF = 0,403 pg.células⁻¹ e Carotenoides / DF = 0,593 pg.célula⁻¹). Cifuentes et al. (1992) *apud* Tafreshi & Shariati (2009) apresentou resultados de oito linhagens de *D. salina* isoladas de tanques salinos abertos que variaram entre 4 e 42 pg.célula⁻¹ e 7,2 e 38 pg.célula⁻¹ na concentração de carotenoides, superiores aos observados no presente estudo.

Devido às diferentes condições de cultivo utilizadas em experimentos, comparar dados de estudos não é tão simples; contudo, os melhores resultados deverão conter elevadas taxas de crescimento específica e de carotenoides por unidade de tempo e por célula, além de volume de cultura sob condições otimizadas (Tafreshi & Shariati 2009).

Tabela 5. Resultados das Concentrações de Pigmentos por célula.

Amostra	Razão Pigmento Densidade			
	Densidade Final (DF) [(x10 ⁵) células.mL ⁻¹]	CI <i>a</i> / DF pg.célula ⁻¹	CI <i>b</i> / DF pg.célula ⁻¹	Carotenoides / DF pg.célula ⁻¹
E1T1	45,45	0,148	0,027	0,163
E3T1	3,24	0,416	0,032	0,724
E3T2	4,68	0,403	0,067	0,593
E3T3	4,04	0,414	0,039	0,715

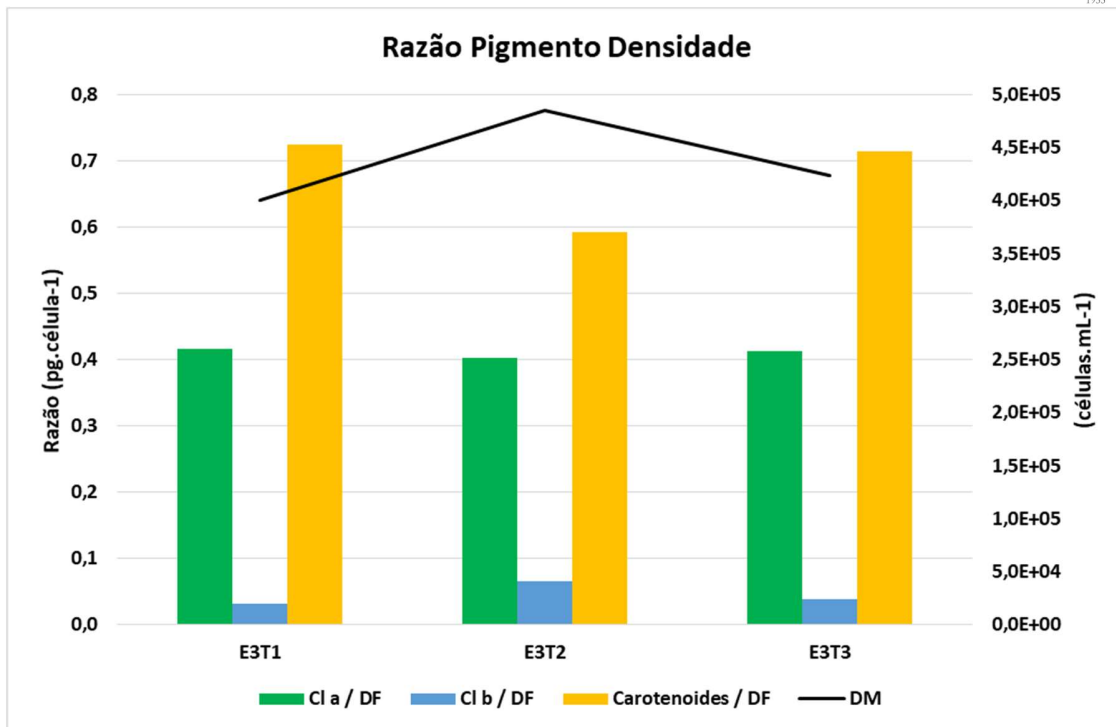


Figura 9. Densidade Celular Máxima (DM) e proporções de pigmentos por célula, considerando CI a, CI b e carotenoides, obtidas no experimento 3.

3.4 Caracterização dos Nutrientes Dissolvidos

Culturas de microalgas fornecem um passo importante no tratamento de efluentes, pois elas promovem tratamento terciário devido à sua habilidade de utilizar nutrientes inorgânicos como nitrogênio e fósforo para seu crescimento (Abdel-Raouf, 2012), além de retirar poluentes para reduzir a eutrofização em ambientes aquáticos (Mata et al., 2010).

Nitrogênio e fósforo são considerados macronutrientes no cultivo de microalgas, necessários em uma proporção de 16N:1P (Andersen, 2005). Alguns estudos não se atentam à proporção N:P no meio em que utilizam para cultivo, contudo isso pode determinar limitações no crescimento e influenciar a composição química e fisiológica das células senescentes (Andersen, 2005).

A melhor fonte de nitrogênio para a espécie *D. salina* é o nitrato, contudo algumas culturas optam por limitar esse nutriente com o objetivo de aumentar a produção de carotenoides (Tafreshi & Shariati, 2019). A redução elevada desse nutriente pode levar à morte das células e consequente redução de carotenoides por volume de cultivo (Tafreshi & Shariati, 2019). O nitrogênio amoniacal também é uma fonte de nitrogênio, contudo quando em excesso pode ser tóxico para o cultivo de microalgas (Andersen, 2005).

De acordo com os resultados da Tabela 6, as concentrações de nitrito nos 3 tratamentos reduziram praticamente por completo (E3T1 0,01 mg.L⁻¹; E3T2 0,00 mg.L⁻¹ e E3T3 0,01 mg.L⁻¹). A amônia, como fonte secundária de nitrogênio, aumentou nos cultivos E3T1 e E3T3, sendo que no E3T2 reduziu de 0,26 mg.L⁻¹ para 0,13 mg.L⁻¹ (50% de redução). Kothari et al. (2013) registraram uma redução na concentração de nitrato de 78,31 mg.L⁻¹ para 2,70 mg.L⁻¹ (96,6%); 5,03 mg.L⁻¹ para 0,03 mg.L⁻¹ de nitrito (99,4%); e 18,45 mg.L⁻¹ para 0,18 mg.L⁻¹ de amônia (99%) utilizando a microalga *C. polypyrenoideum* no tratamento de efluente de indústria de laticínio. Estes resultados são de culturas com 75% de efluente em culturas durante 15 dias.

Tabela 6. Resultados das concentrações iniciais e finais de Nutrientes Dissolvidos no experimento 3. Porcentagens representam o montante final contido no efluente tratado.

Tempo	Parâmetros (mg.L ⁻¹)	
	Nitrito	Amônia
Dia 0	0,20	0,26
Dia 17 E3T1	0,01	0,44
Dia 17 E3T2	0,00	0,13
Dia 17 E3T3	0,01	0,28

4.0 Conclusão

O cultivo de microalgas tem grande potencial no ramo de tratamento de efluente de indústria alimentícia, uma vez que os nutrientes podem ser utilizados no crescimento das culturas. Os resultados demonstraram que cultivos de 15 a 20 dias podem atingir densidades de até $24,15 \times 10^5$ células.mL⁻¹ com 50% de EFLU1 e $4,85 \times 10^5 \pm 0,48$ células.mL⁻¹ com 20% de EFLU2 enriquecido com vitaminas e metais, mas que as densidades não estão diretamente associadas com elevada produção de pigmentos.

Culturas em condições de estresse como elevadas taxas de salinidade, oscilações na temperatura, elevada irradiação e deficiência de nutrientes tendem a aumentar a produção de pigmentos nas células das microalgas, ativando mecanismos de defesa; contudo, pode reduzir a densidade celular máxima. Os maiores valores de carotenoides por unidade de célula foram com 20% de EFLU2 sem adição de nutrientes (0,724 pg.célula⁻¹) e com 20% de EFLU2 com adição de vitaminas, metais e fosfato (0,715 pg.célula⁻¹).

Destaca-se que existem custos envolvidos no enriquecimento com nutrientes nos cultivos, e o tratamento em grande escala, para atender a uma indústria poderia gerar custos muito elevados. Contudo, o tratamento sem adição de nutrientes foi o que apresentou melhores produções de carotenoides por unidade de célula, como mencionado acima. Adicionalmente, as concentrações de nitrito no cultivo E3T2 reduziram de 0,20 mg.L⁻¹ para 0,01 mg.L⁻¹; e o nitrogênio amoniacal reduziu de 0,26 mg.L⁻¹ para 0,13 mg.L⁻¹.

A aplicação dos componentes produzidos pelas microalgas é vasta, não se limitando aos aditivos alimentares, apesar de ser de grande valor pela atual tendência do mercado de consumidores de produtos naturais. Há também aplicações no ramo de cosméticos, insumos químicos e biocombustíveis.

Para experimentos futuros sugere-se que sejam feitas análises diárias ou em intervalos curtos de tempo para os nutrientes dissolvidos, além de medir também o fosfato e nitrato presente antes e após os tratamentos. Para a aplicação comercial do glicerol, também sugere-se análises de conteúdo de lipídeos. Com relação aos parâmetros

bióticos também sugere-se realizar a pesagem de biomassa seca, como parâmetro adicional para análise do crescimento e possível aplicação da biomassa em outros setores como o de biocombustíveis. Entretanto, apesar das limitações de tempo para os cultivos e análises, os resultados foram satisfatórios e demonstraram o potencial do tratamento de efluente de indústria alimentícia utilizando-se culturas de microalgas da espécie *Dunaliella salina*.

5.0 Referências

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A. and Ibraheem, I. B. M. 2012. Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences, vol. 19, pp. 257-275.

Agência Nacional de Águas – Brasil (2019). Quantidade de Água. Acesso em 11/11/2019, disponível em: <https://www.ana.gov.br/panorama-das-aguas/quantidade-da-agua>.

ANDERSEN, R.A. 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA. 1st edition.

BAUMGARTEN, M.G.Z.; ROCHA, J.M.B.; NIENCHESKI, L.F.H. 1996. Manual de análises de oceanografia química. Editora da FURG. Rio Grande, 164 p.

BENDSCHNEIDER, K.; ROBINSON, R.J. 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. Journal of Marine Research, v.11, p.87-96.

BRASIL, Resolução CONAMA nº430, de 13 de maio de 2011. Condições e padrões de lançamento de efluentes. Publicado no D.O.U. Nº 92, de 16 maio 2011, pág. 89.

BRASIL, Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Publicada no D.O.U. nº 053, de 18 de março de 2005, págs. 58-63.

CANDIDO, C. et al. 2015. Cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça filtrada. Revista Brasileira de Ciências Ambientais. ISSN Eletrônico 2176-9478.

Cardoso, A. S., Vieira, G. E. G., Marques, A. K. 2011. O Uso de Microalgas para a Obtenção de Biocombustíveis. Revista Brasileira de Biociências, v. 9, n. 4, pp. 542-549.

Christenson, L. and Sims, R. 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances* Volume 29, Issue 6, Pages 686- 702.

DA FRÉ, N.C. 2016. Influência das condições de cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta* na produção de carotenoides e lipídios. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

EMBRAPA AGROENERGIA, 2019. Biorrefinaria. Parque Estação Biológica (PqEB). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/48750/1/biorrefinaria-modificado-web.pdf>. Acesso em 11/11/2019.

FAROOQ, W. et al. 2013. Two-Stage Cultivation of two *Chlorella* sp. Strains by Simultaneous Treatment of Brewery Wastewater and Maximizing Lipid Productivity. *Bioresource Technology* 132:230-8.

FOGG, G.E.; THAKE, B. 1987. *Algae cultures and phytoplankton ecology*, 3rd edition. The University of Wisconsin Press, Ltd., London, 269p.

GARCÍA-GONZÁLEZ, M. et al. 2003. Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *Journal of Applied Phycology* 15: 177–184.

Goel, P. K. 1997. 2006. *Water Pollution: Causes Effects and Control*. New Age International ISBN, 812241009X, 9788122410099.

GRASSHOFF, K.M.; EHRHARDT, K.; KREMLING, K. 1983. *Methods of seawater analysis*. Second, revised and extended edition. Weinheim; Deerfield Beach, Florida; Basel: Verlag Chemie. 419 p.

GUILLARD, R.R.L.; RYTHER, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* (Hustedt), and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian journal of microbiology*, v. 8(2): 229-239.

JEFFREY, S.W.; HUMPHREY, G.F. 1975. New espectrofotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algal and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Planzen (BPP)* Bd.167 S 191-194.

KOLLER, M. et al. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research* 6 (2014) 52–63.

KOROLEFF, F. 1969. Direct determination of ammonia in natural Waters as indophenol blue. *I.C.E.S. C.M. 1969/C: 9* (mimeo.): 4 pp.

Kothari, R., Prasad, R., Kumar, V., Singh, D. P. 2013. Production of biodiesel from microalgae *Chlamydomonas polypyrenoideum* grown on dairy industry wastewater. *Bioresource Technology*. Volume 144, September 2013, Pages 499-503.

Kotteswari, M & Subbiah, Murugesan & RK, R. 2012. Phycoremediation of dairy effluent by using the microalgae *Nostoc* sp. *Int J Environ Res Dev*. 2. 35-43.

LAMERS, P. P. et al. 2008. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol*. 26(11):631-8.

LORENZEN, C.J. 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigment: espectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, 12:343-346.

LOURENÇO, S.O. 2006. *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. São Carlos: RiMa, 2006. p. 606.

MATA, T. M. 2010. Microalger for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217–232.

MMA – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA nº430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Publicado no D.O.U. Nº 92, de 16 maio 2011, pág. 89.

PARSONS, T.R., MAITA, Y. AND C.M. LALLI, 1984. A manual of chemical and biological methods for sea water analysis. Pergamon Press, Oxford.

Rodrigues et al. 2014. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. Food Research International 65 144–148.

RUIZ, J. et al. (2016). Towards industrial products from microalgae. Energy Environ. Sci., 2016, 9, 3036.

SANTOS, B. 2016. Estratégias para aumentar a produtividade de biomassa de microalgas com carbono orgânico. Acesso em 11/11/2019, disponível em: <http://www.pipe.ufpr.br/portal/defesas/dissertacao/310.pdf>.

SCHNEIDER, O.; SERETI, V.; EDING, E.H.; VERRETH, J.A.J. 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. Aquacultural Engineering., 32: 379–401.

Schwarzenbach et al. 2010. Global Water Pollution and Human Health. Biotechnology Advances. Volume 29, Issue 6, Pages 686-702.

SchwPerez-Garcia et al., Escalante, de-Bashan, & Bashan. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. Water Res.; 45(1):11-36.

SEBASTIEN, N. Y. and KLEIN, V. L. M. 2006. Efeito do meio Erd Schreiber no cultivo das microalgas *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana* = Erd Schreiber medium effect in culture of microalgae *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* and *Isochrysis galbana*. Acta Scientiarum Biological Sciences 28(2).

Stephenson, G. A. and Solomon, K. R. 1993. Pesticides and the Environment. Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.

TAFRESHI, A.H.; SHARIATI, M. 2009. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. Journal of Applied Microbiology, 107: 14-35.

Tarlan et al. 2002. Effectiveness of algae in the treatment of a wood-based pulp and paper industry wastewater. Bioresource Technology 84 1–5.

TINOCO, N.A.B.; TEIXEIRA, C.M.L.L.; REZENDE, C.M. 2015. O Gênero *Dunaliella*: Biotecnologia e Aplicações. *Rev. Virtual Quím*, 7(4): 1421-1440.

Umamaheswari, J. and Shanthakumar, S. 2016. Efficacy of microalgae for industrial wastewater treatment: a review on operating conditions, treatment efficiency and biomass productivity. *Rev Environ Sci Biotechnol* 15:265-284.

VON SPERLING, Marcos. 2005. Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos (Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias; vol. 1). Belo Horizonte: DESA-UFMG, 452p.